

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **2000125854 A**

(43) Date of publication of application: **09.05.00**

(51) Int. Cl

C12N 5/06
A61B 5/107
G01N 33/48

(21) Application number: **10318347**

(22) Date of filing: **21.10.98**

(71) Applicant: **POLA CHEM IND INC**

(72) Inventor: **FUJIWARA NORIO**
KASHIBUCHI NOBUO
HIRAI YOSHIKAZU
MIYAZAWA MASAKAZU

(54) **DYEING OF SKIN KERATINOCYTE**

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for dyeing skin keratinocyte, capable of judging area and shape of skin keratinocyte in good accuracy.

SOLUTION: This method for dyeing skin keratinocyte

comprises using one or two or more kinds of compounds selected from a group comprising tannic acid, chromium salts, aluminum salts, glutaraldehyde and formalin as a mordant. Dyeing property of cell structure, especially skin keratinocyte is remarkably improved thereby and the cell can be dyed in good contrast.

COPYRIGHT: (C)2000,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-125854

(P2000-125854A)

(43) 公開日 平成12年5月9日(2000.5.9)

| (51) Int.Cl. ⁷ | 識別記号 | F I | テーマコード [*] (参考) |
|---------------------------|------|---------------|--------------------------|
| C 1 2 N 5/06 | | C 1 2 N 5/00 | E 2 G 0 4 5 |
| A 6 1 B 5/107 | | G 0 1 N 33/48 | P 4 B 0 6 5 |
| G 0 1 N 33/48 | | A 6 1 B 5/10 | 3 0 0 Q 4 C 0 3 8 |

審査請求 未請求 請求項の数9 F D (全 4 頁)

(21) 出願番号 特願平10-318347

(22) 出願日 平成10年10月21日(1998.10.21)

(71) 出願人 000113470

ポーラ化成工業株式会社
静岡県静岡市弥生町6番48号

(72) 発明者 藤原 典雄

神奈川県横浜市神奈川区高島台27番地1
ポーラ化成工業株式会社横浜研究所内

(72) 発明者 樫淵 暢夫

神奈川県横浜市神奈川区高島台27番地1
ポーラ化成工業株式会社横浜研究所内

(72) 発明者 平井 義和

神奈川県横浜市神奈川区高島台27番地1
ポーラ化成工業株式会社横浜研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 皮膚角質細胞の染色方法

(57) 【要約】

【目的】 皮膚角質細胞の面積や形態を精度良く判定可能な、皮膚角質細胞の染色方法を提供する。

【構成】 タンニン酸、クロム塩類、アルミニウム塩類、グルタルアルデヒド、ホルマリンの群から選ばれる一種または二種以上を媒染剤として使用する事により、細胞組織、特に皮膚角質細胞の染色性が格段に向上し、良好なコントラストで染色可能となる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 皮膚角質細胞を染色する際に、染色剤と媒染剤とを皮膚角質細胞に同時に作用させることを特徴とする皮膚角質細胞の染色方法。

【請求項 2】 皮膚角質細胞を染色する際に、皮膚角質細胞に媒染剤を作用させた後に染色剤を作用させることを特徴とする皮膚角質細胞の染色方法。

【請求項 3】 媒染剤としてタンニン酸、クロム塩類、アルミニウム塩類、グルタルアルデヒド、ホルマリンの群から選ばれる一種又は二種以上を使用することを特徴とする請求項 1 又は 2 の何れかに記載の皮膚角質細胞の染色方法。

【請求項 4】 使用する媒染剤溶液の濃度が、1～1,000ppmであることを特徴とする請求項 1～3 の何れかに記載の皮膚角質細胞の染色方法。

【請求項 5】 使用する媒染剤溶液の濃度が、10～100ppmであることを特徴とする請求項 1～4 の何れかに記載の皮膚角質細胞の染色方法。

【請求項 6】 媒染剤がタンニン酸であることを特徴とする請求項 1～5 の何れかに記載の皮膚角質細胞の染色方法。

【請求項 7】 請求項 1～6 の何れかに記載の染色方法を用いて染色された皮膚角質細胞を用いて評価することを特徴とする皮膚状態の評価方法。

【請求項 8】 請求項 1～6 の何れかに記載の染色方法を用いて染色された皮膚角質細胞の顕微観察画像を計測工学的に測定し、測定部位の測定値に基づいて皮膚状態を評価する方法。

【請求項 9】 測定項目が皮膚角質細胞面積である請求項 7 又は 8 の何れかに記載の皮膚状態の評価方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、皮膚角質細胞の染色方法に関し、詳しくは媒染剤としてタンニン酸、クロム塩類、アルミニウム塩類、グルタルアルデヒド、ホルマリンの群から選ばれる一種または二種以上を染色剤と同時に、又は媒染剤を作用させた後に染色剤を作用させることを特徴とする皮膚角質細胞の染色方法に関するものであり、更には、このような方法で染色された皮膚角質細胞を皮膚状態の評価に用いる皮膚状態の評価方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】従来より、顕微観察を容易に行うために、生体材料を染色した後、顕微観察の試料として提供することが行われている。このような染色方法のうち、皮膚角質細胞の染色を目的とする場合には、古くはヘマトキシリン・エオジン染色が行われ、その他、メチレンブルー、ローダミンB、ゲンチアナバイオレット、ブリリアントグリーンなどもよく用いられている。これらの方法では、染色原理が未解明なものも多く、良好な染色

を行うにはたぶんに経験的な要素を必要とする。そのため、これら従来から用いられている染色方法ではいずれも染色が薄くなりがちで、背景とのコントラスト比が十分得られないことが多い。

【0003】しかし、肉眼で直接細胞の形状等を官能的に評価する場合には、低コントラストの染色方法でも長年の観察経験で補いがつくこともあるが、一般的には顕微標本が見づらいことは好ましいことではない。特に、例えばコンピュータを利用した画像解析システムを利用して細胞面積を算出する等の評価方法に应用する場合には、低コントラストの染色では、機械的な判別精度が低下し、正確な評価データが得にくくなるという問題があった。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、以上のような状況に鑑みてなされたものであって、その目的は皮膚角質細胞をコントラストよく染色することによって、肉眼観察、特に画像解析に適した皮膚角質細胞の染色方法を提供することである。

【0005】

【課題を解決するための手段】こうした現状に鑑み、鋭意研究を行った結果、本発明者らは、タンニン酸、クロム塩類、アルミニウム塩類、グルタルアルデヒド、ホルマリンの群から選ばれる一種または二種以上を媒染剤として使用する事により、細胞組織、特に皮膚角質細胞の染色性が格段に向上し、良好なコントラストで染色できることを見だし、本発明を完成させるに至ったものである。

【0006】

【発明の実施の形態】以下、本発明について詳細に説明する。本発明を適用する皮膚角質細胞は、例えば頬や上腕内側部からテープストリッピング等の公知の手法により採取した皮膚角質細胞を用いるが、もちろん採取部位はこれに限定されるものではない。

【0007】このようにして皮膚から採取された角質細胞は適当な方法でスライドガラス等の観察用基盤に転写され、タンニン酸、クロム塩類、アルミニウム塩類、グルタルアルデヒド、ホルマリンの群から選ばれる一種または二種以上を媒染剤として、角質細胞の染色に使用可能な染色剤で染色される。

【0008】媒染剤は染色剤と同時に作用させてもよいし、あるいは媒染剤を作用させた後に染色剤で染色を行ってもよいが、媒染剤を作用させた後に染色剤を作用させた方が染色のコントラストが高くなり、より好ましい。

【0009】このような媒染剤としては、タンニン酸、重クロム酸カリ等のクロム塩類、硫酸アンモニウムアルミニウム等のアルミニウム塩類、グルタルアルデヒド、ホルマリンを使用することができるが、これら媒染剤の中でも、タンニン酸がもっとも染色性が向上するの

で好ましい。安全性の点からも、クロム塩類、アルミニウム塩類、グルタルアルデヒド、ホルマリンは環境汚染の面や、作業者の安全衛生面から見てあまり好ましくない。

【0010】以下、実施例により、本発明を詳細に説明する。

【0011】皮膚角質細胞の標本は特開平6-82443号に記載の方法に従って作成した。すなわち、皮膚表面の角質細胞をセロファンテープに写し取り（テープストリップング）、テープの細胞が付着している側をスライドガラスに延展したビニール用接着剤に貼付し、スラ

*イドガラスをエタノール、キシレンに浸漬して接着剤を溶解させ、スライドガラスからテープを剥離し、ベースとなる染色用の皮膚角質層をスライドガラスに貼付したものを作製した。

【0012】

【媒染剤処理後染色の実施例】皮膚角質細胞をスライドガラスに貼付したものに、表1に示す媒染剤を作用させた後、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、その後スライドガラス上の試料をバルサムで封入した。

【0013】

【表1】

| | 媒染剤 | 媒染剤濃度 | 処理時間 |
|------|----------------|--------|------|
| 実施例1 | タンニン酸 | 1 ppm | 15分 |
| 実施例2 | タンニン酸 | 10 ppm | 15分 |
| 実施例3 | タンニン酸 | 50 ppm | 15分 |
| 実施例4 | 硫酸アンモニウムアルミニウム | 1 ppm | 15分 |
| 実施例5 | 硫酸アンモニウムアルミニウム | 10 ppm | 15分 |
| 実施例6 | 硫酸アンモニウムアルミニウム | 50 ppm | 15分 |
| 実施例7 | グルタルアルデヒド | 1 ppm | 15分 |
| 実施例8 | グルタルアルデヒド | 10 ppm | 15分 |
| 実施例9 | グルタルアルデヒド | 50 ppm | 15分 |

【0014】

【媒染剤と同時染色の実施例】皮膚角質細胞をスライドガラスに貼付したものに、表2に示す媒染剤を作用させながら同時にヘマトキシリン・エオジン染色を行い、その後スライドガラス上の試料をバルサムで封入した。

【0015】

【表2】

| | 媒染剤 | 媒染剤濃度 | 処理時間 |
|-------|----------------|---------|------|
| 実施例10 | タンニン酸 | 10 ppm | 15分 |
| 実施例11 | タンニン酸 | 50 ppm | 15分 |
| 実施例12 | タンニン酸 | 100 ppm | 15分 |
| 実施例13 | 硫酸アンモニウムアルミニウム | 10 ppm | 15分 |
| 実施例14 | 硫酸アンモニウムアルミニウム | 50 ppm | 15分 |
| 実施例15 | 硫酸アンモニウムアルミニウム | 100 ppm | 15分 |
| 実施例16 | グルタルアルデヒド | 10 ppm | 15分 |
| 実施例17 | グルタルアルデヒド | 50 ppm | 15分 |
| 実施例18 | グルタルアルデヒド | 100 ppm | 15分 |

【0016】

【比較例】皮膚角質細胞をスライドガラスに貼付したものに、媒染剤を使用せずにヘマトキシリン・エオジン染色を行い、その後スライドガラス上の試料をバルサムで封入した。

【0017】このようにして染色された、実施例及び比較例の皮膚角質細胞のスライド標本から、顕微鏡を通して画像解析システムに角質細胞の画像を取り込み、背景と角質細胞を区別するために明度差50%を閾値として2値化を実施した。視野中100個当たりの角質細胞についての認識率を表3に示す。

【0018】

【表3】

| | 認識率 (%) |
|-------|---------|
| 実施例1 | 90 |
| 実施例2 | 100 |
| 実施例3 | 98 |
| 実施例4 | 82 |
| 実施例5 | 86 |
| 実施例6 | 92 |
| 実施例7 | 78 |
| 実施例8 | 86 |
| 実施例9 | 84 |
| 実施例10 | 90 |
| 実施例11 | 88 |
| 実施例12 | 82 |
| 実施例13 | 72 |
| 実施例14 | 68 |
| 実施例15 | 70 |
| 実施例16 | 76 |
| 実施例17 | 71 |
| 実施例18 | 74 |
| 比較例 | 55 |

【0019】表3の結果に見られるように、媒染剤を使用せずに染色した比較例に比べ、本発明の媒染剤を使用する染色方法では、画像解析による細胞認識率が格段に向上することが証明された。かかる効果は媒染剤と染色剤を同時に使用するよりも、媒染剤を作用させた後に染色剤を作用させた方がより効果的であった。また、タンニン酸の濃度を100~1,000ppmまでは100ppmごと、1,000~10,000ppmでは1,000ppmごとに濃度を振って、同様の試験を実施したところ、100ppm~1,000ppmの範囲ではほぼ同等の細胞認識率を示し、染色性の向上は特に認められず、1,000ppm以上の濃度では、逆に細胞認識率がわずかながら低下する傾向を示した。このよう

に、本発明の染色方法では、使用する媒染剤の濃度が、
1～1,000ppm、特に10ppm～100ppm
で良好な染色性の向上効果を発揮するものであり、経済
的にも負担の少ないものである。

【0020】

【発明の効果】本発明の皮膚角質細胞の染色方法によれ

ば、画像解析装置による細胞認識率を大きく向上させる
ことができ、被験者が使用するのに適した化粧品等を選
定するために必要な肌質評価等を精度良く実施すること
が可能となる。また、肉眼による観察評価も非常に容易
となる。

フロントページの続き

(72)発明者 宮澤 雅一
神奈川県横浜市神奈川区高島台27番地1
ポーラ化成工業株式会社横浜研究所内

Fターム(参考) 2G045 BA14 BB25 CB01 CB09 FA16
GB01 GB10 GC30
4B065 AA93X BD22 BD26 BD28
BD34 BD50 CA46
4C038 VA20 VB22 VC01